

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Polyester synthase gene and process for producing polyester

Patent Number: ☐ EP0824148, A3
Publication date: 1998-02-18
Inventor(s): YOSHIHARU DOI (JP); TOSHIKI FUKUI (JP)
Applicant(s):: RIKAGAKU KENKYUSHO (JP)
Requested Patent: ☐ JP10108682
Application Number: EP19970113932 19970813
Priority Number(s): JP19960214509 19960814; JP19970199979 19970725
IPC Classification: C12N15/52 ; C12N15/60 ; C12N1/21 ; C12P7/62 ; C12N15/74
EC Classification: C12N9/00L, C12N9/88, C12P7/62A
Equivalents: JP3062459B2, ☐ US5981257

Abstract

The present invention relates to a polyester synthase gene coding for a polypeptide containing the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a sequence where in said amino acid sequence, one or more amino acids are deleted, replaced or added, said polypeptide bringing about polyester synthase activity; a gene expression cassette comprising the polyester synthase gene and either of open reading frames located upstream and downstream of said gene; a recombinant vector comprising the gene expression cassette; a transformant transformed with the recombinant vector; and a process for producing polyester by culturing the transformant in a medium and recovering polyester from the resulting culture.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-108682

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月28日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

B

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

9/88

9/88

C 1 2 P 7/62

C 1 2 P 7/62

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-199979

(22) 出願日 平成9年(1997) 7月25日

(31) 優先権主張番号 特願平8-214509

(32) 優先日 平8(1996) 8月14日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 福居 俊昭

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72) 発明者 土肥 義治

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ポリエステル重合酵素遺伝子及びポリエステルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びポリエステルの製造方法の提供。

【解決手段】 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらすポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子、該ポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方とを含む遺伝子発現カセット、前記ポリエステル合成酵素遺伝子又は遺伝子発現カセットを含む組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された形質転換体、該形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらしポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子。

【請求項2】 配列番号1で表される塩基配列を含むポリエステル重合酵素遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2記載のポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方を含む遺伝子発現カセット。

【請求項4】 ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項5】 ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号3で表される塩基配列を含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項6】 ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号6で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、エノイル-CoAヒドラーゼ活性をもたらしポリペプチドをコードするDNAを含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項7】 ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号5で表される塩基配列を含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

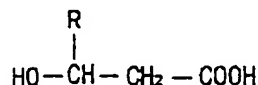
【請求項8】 請求項1若しくは2記載のポリエステル重合酵素遺伝子又は請求項3～7のいずれか1項に記載の遺伝子発現カセットを含む組換えベクター。

【請求項9】 請求項8記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項10】 請求項9記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルの採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【請求項11】 ポリエステルが、次式I：

【化1】



(Rは水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアリカン酸の共重合体である請求項10記載のポリエステルの製造方法。

【請求項12】 ポリエステルが、ポリ(3-ヒドロキシシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体である請求項10記載のポリエステルの製造

方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及び該形質転換体を用いたポリエステルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】数多くの微生物は、ポリ-3-ヒドロキシシブチレート(P(3HB))を生合成し、エネルギーの貯蔵物質として体内に微粒子状で蓄えることが知られている。微生物体内から抽出したP(3HB)は、180℃程度に融解温度をもつ熱可塑性高分子であり、優れた生分解性と生体適合性を示すことから、環境を保全する“グリーン”プラスチックとして注目されている。また、P(3HB)は各種の微生物を用いて糖や植物油などの再生可能炭素資源から合成できる“グリーン”プラスチックである。しかしながら、P(3HB)は、高結晶性高分子のために耐衝撃性が劣るという物性上の問題があり、実用化が見送られてきた。

【0003】近年、3-ヒドロキシシブチレート(3HB)と3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との2成分共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP(3HB-co-3HH)共重合体の製造法は、土より単離したアエロモナス・キャビエ(Aeromonas caviae)を用いてオレイン酸やオリーブオイルから発酵生産するものである。発酵生産したP(3HB-co-3HH)共重合体は、3HHユニット分率の増加とともに結晶化度が低下するために、柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れ、強い糸や透明でしなやかなフィルムにも加工できることが明らかにされている(Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, Macromolecules 28, 4822-4823 (1995))。しかしながら、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報に記載の製造方法では、ポリエステルの収率(乾燥微生物体内のポリエステル含有量)が低いため、P(3HB-co-3HH)共重合ポリエステルの高収率で生産する方法の開発が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された形質転換体及び該形質転換体を用いたポリエステルの製造方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ポリエステル重合酵素の遺伝子をクローニングし、さらにポリエステル重合酵素遺伝子に付随する上流及び下流のオープンリーディング

グフレームのいずれか一方又は両方を欠失させることによりポリエステルを高収率で生産することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらずポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子である。該遺伝子としては、例えば配列番号1で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

【0007】さらに、本発明は、前記ポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方とを含む遺伝子発現カセットである。該遺伝子発現カセットにおいて、ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームとしては、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むもの（例えば配列番号3）が挙げられ、ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームとしては、配列番号6で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、エノイル-CoAヒドラーゼ活性をもたらずポリペプチドをコードするDNAを含むもの（例えば配列番号5）が挙げられる。

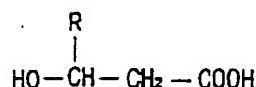
【0008】ここで、本発明のポリエステル重合酵素遺伝子は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じて、当該アミノ酸配列を有するポリペプチドがポリエステル重合活性を有する限り、そのポリペプチドをコードするDNAも本発明の遺伝子に含まれる。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列の第1番目のメチオニンが欠失したものをコードするDNAも、本発明の遺伝子に含まれる。

【0009】さらに、本発明は、前記ポリエステル重合酵素遺伝子又は前記遺伝子発現カセットを含む組換えベクターである。さらに、本発明は、前記組換えベクターによって形質転換された形質転換体である。

【0010】さらに、本発明は、前記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルの採取することと特徴とするポリエステルの製造方法である。ポリエステルとしては、例えば、次式1：

【0011】

【化2】



【0012】（Rは水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。）で示される3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体（例えば、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート）ランダム共重合体）が

挙げられる。以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】

(1) ポリエステル重合酵素遺伝子のクローニング

本発明のポリエステル重合酵素遺伝子は、アエロモナス属に属する微生物の菌体から分離される。まず、ポリエステル重合酵素遺伝子を有する菌株から染色体DNAを作製する。菌株としては、例えばアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) が挙げられる。

10 【0014】染色体DNAの調製は公知の方法を用いることができる。例えば、アエロモナス・キャビエをLB培地で培養した後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 2.4.3 頁, John Wiley & Sons 出版, 1994年) 等により染色体DNAを調製する。

【0015】上記の手法により得られたDNAを適当な制限酵素（例えばSau3A1, BamHI, BglII等）で部分分解した後、アルカリホスファターゼ処理を行い、DNA断片を脱リン酸化する。これを制限酵素（例えばBamHI, BglII等）で切断したベクターとライゲーションを行

20 い、ライブラリーを作成する。
【0016】ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。ファージベクターとしては、例えばEMBL3、ML3、λgt11等が挙げられ、プラスミドベクターとしては、例えばpBR322、pUC18、pBluescript II (STRATAGENE社製) 等が挙げられる。さらに、大腸菌やバチルス・プレビスなどの2種以上の宿主微生物で自律的増殖が可能なベクターのほか、各種のシャトルベクターを使用することもできる。
30 このようなベクターについても、前記制限酵素で切断し、その断片を得ることができる。

【0017】DNA断片とベクター断片とを連結させるには、公知のDNAリガーゼを用いる。そして、DNA断片とベクター断片とをアニーリングさせた後連結させ、組換えベクターを作成する。

【0018】宿主微生物に組換えベクターを導入するには、公知の方法により行うことができる。例えば、宿主微生物が大腸菌の場合はカルシウム法 (Lederberg, E.M. et al., J. Bacteriol. 119, 1072 (1974)) やエレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.4 頁, 1994年) を採用することができ、宿主微生物がファージDNAの場合はインビトロ・パッケージング法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 5.7.1 頁, 1994年) 等を採用することができる。本発明では、インビトロ・パッケージング用キット (Gigapack II; STRATAGENE 社製等) を用いることもできる。

【0019】次に、アエロモナス・キャビエのポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得るためのプローブを調製する。ポリエステル重合酵素のアミノ酸配列

については、既に何種類かのものが知られている (Peoples, O.P. and Sinskey, A.J., J.Biol.Chem., 264, 15293 (1989); Huisman, G.W. et al., J.Biol.Chem., 266, 2191 (1991); Pieper, U. et al., FEMS Microbiol.Lett., 96, 73 (1992) 他)。そこで、これらのアミノ酸配列のうち、保存されている2つの領域を選択し、それをコードする核酸塩基配列を推定してオリゴヌクレオチドを設計する。これらオリゴヌクレオチドとしては、例えば5'-CC(C/G)CC(C/G)TCGATCAA(T/C)AAGT(T/A)(T/C)TAT(T/C)ATC-3' (配列番号7)、及び5'-(G/C)ACCCA(G/C)CC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GCCACCA-3' (配列番号8)で表される2種類のオリゴヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0020】これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、アエロモナス・キャピエの染色体DNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Molecular Cloning, 2巻, 14.2頁, 1989年) を行う。そして、PCRによりポリエステル重合酵素遺伝子を部分的に増幅する。

【0021】次に、この部分増幅断片を適当な試薬を用いて標識し、前記染色体DNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションを行う (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 6.0.3頁, 1994年)。

【0022】コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングされた大腸菌からアルカリ法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.6.1頁, 1994年) によってプラスミドを回収することにより、ポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片が得られる。

【0023】上記DNA断片の塩基配列の決定は、公知方法、例えばサンガー法 (Molecular Cloning, 2巻, 13.3頁, 1989年) 等によって行うことができ、塩基配列自動分析装置、例えば373A・DNA シークエンサー (Applied Biosystems社) 等を用いて行うことができる。

【0024】配列番号1に本発明のポリエステル重合酵素遺伝子の塩基配列を、配列番号2に該遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を示すが、当該アミノ酸配列を有するポリペプチドがポリエステル重合活性をもたらず限り、アミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等の変異があってもよい。また、本発明の遺伝子は、配列番号2で表されるアミノ酸をコードする塩基配列をもつもののほか、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものである。

【0025】なお、上記欠失等の変異は、公知の部位突然変異誘発方法 (Current Protocols in Molecular Biology 1巻, 8.1.1頁, 1994年) により誘発することができる。上記手法により塩基配列が決定された後は、化学合成によって、又は染色体DNAを鋳型としたPCR法によって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

【0026】(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組み換えベクターを、該組み換えベクターを作製する際に用いた発現ベクターに適合する宿主中に導入することにより得られる。宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、アルカリゲネス属に属する微生物、シュードモナス属に属する微生物、バチルス属に属する微生物等の細菌、サッカロミセス属、カンジダ属等の酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞などが挙げられる。

【0027】アルカリゲネス属に属する微生物、シュードモナス属に属する微生物等の細菌を宿主として用いる場合は、本発明の組換え体DNAが該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、本発明のDNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、広範囲の宿主において複製・保持されるRK2複製起点を有するpLA2917(ATCC 37355)、あるいはRSF1010複製起点を有するpJRD215(ATCC 37533) 等が挙げられる。

【0028】プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trp プロモーター、lac プロモーター、P_l プロモーター、P_o プロモーター、T7プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組み換え体DNAの導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.1頁, 1994年)、エレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.4頁, 1994年) 等が挙げられる。

【0029】酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えばYEpl3、Ycp50等が挙げられる。プロモーターとしては、例えばgal 1 プロモーター、gal 10プロモーター等が挙げられる。酵母への組換え体DNAの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法 (Methods. Enzymol., 194, 182-187 (1990))、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

【0030】動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社) 等が用いられる。動物細胞への組換え体DNAの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法等が挙げられる。

【0031】ここで、前記のようにして決定された塩基配列は、ポリエステル重合酵素遺伝子のはかに、その上流及び下流にポリエステル合成に関与する遺伝子のオープンリーディングフレームが複数含まれている。すなわち、ポリエステル重合酵素遺伝子は、単一のプロモーター領域の支配下に少なくとも2個のORFとともにオペロンを形成している。

【0032】ポリエステル重合酵素遺伝子上流に位置するORFを以下「ORF1」といい、下流に位置するORFを以下「ORF3」という。ORF1は、菌体内ポリエステルの蓄積に関与する遺伝子又はポリエステル生合成系遺伝子のものと思われる。また、ORF3は、ポリエステル生合成に関与するエノイル-CoAヒドラーゼ（特に(R)-特異的エノイル-CoAヒドラーゼ）をコードする遺伝子のものであることを明らかにした。

【0033】本発明では、図1に示すように、発現制御領域（図1(1)において「-35/-10」と表示）、ポリエステル重合酵素遺伝子、ORF1及びORF3を含むEcoRI断片をクローニングした（図1(1)）。この断片をEE32とする。

【0034】次に、EE32においてORF1又はORF3のいずれか一方又は両方を欠失させた断片（遺伝子発現カセット）を作製し、このカセットを宿主に導入することにより、ポリエステルの効率よく生産することができる形質転換体を得ることができる。

【0035】EE32中、発現制御領域とORF1の翻訳開始領域との間、及びORF1の翻訳停止領域とポリエステル重合酵素遺伝子の翻訳開始領域との間にそれぞれ制限酵素BglII部位を導入し、BglIIによりORF1を欠失させる（図1(2)）。これと同様にして、ポリエステル重合酵素遺伝子の翻訳停止領域とORF3との間に制限酵素BamHI領域を挿入し、BamHI処理によりORF3を欠失させる（図1(3)）。

【0036】ORF1及びORF3の両者を欠失させるには、EE32について、上記ORF1及びORF3を欠失させる操作を両方行えばよい（図1(4)）。なお、制限酵素部位は、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異法（Curmt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 8.1.1 頁, 1994年）によって導入することができる。

【0037】このようにして得られたそれぞれの遺伝子発現カセットを、前記発現可能なプラスミド（例えばpJRD215 (ATCC 37533)）に挿入し、得られた組換えベクターを用いて、アルカリゲネス・ユートロファス（*Alcaligenes eutrophus*）・PHB-4株（DSMZ41）（ポリエステル合成能欠損株）を形質転換する。形質転換法としては、例えば塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、低pH法、インビトロ・パッケージングによる方法、接合伝達法等が挙げられる。

【0038】(3)ポリエステルの製造

ポリエステルの製造は、本発明の形質転換体を培地で培養し、培養菌体又は培養物中に本発明のポリエステルの生成蓄積させ、該培養菌体又は培養物から該ポリエステルを採取することにより行われる。本発明の形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0039】アルカリゲネス属に属する微生物又はシェードモナス属に属する微生物等の細菌を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源を与え、窒素源、無機塩類及び有機栄養源のうちのいずれかを制限した培地、例えば窒素源を0.01～0.1%に制限した培地が挙げられる。

【0040】炭素源は微生物の増殖に必要であり、かつ、ポリエステル合成の原料となるものであり、その例としては、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、マルトース等の炭水化物が挙げられる。また、炭素数2以上の油脂関連物質を炭素源とすることもできる。炭素数2以上の油脂関連物質としては、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、バーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油又は牛油などの天然油脂、酢酸、プロピオン酸、ブタン酸、ペンタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、リノール酸若しくはミリスチン酸等の脂肪酸又はこれら脂肪酸のエステル、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール若しくはパルミチルアルコール等又はこれらアルコールのエステル等が挙げられる。

【0041】窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー等が挙げられる。無機物としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0042】培養は、通常振盪培養などの好気的条件下、25～37℃で発現誘導後24時間以上（例えば1～7日）行う。培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。そして、培養することによりポリエステルの菌体内に蓄積させ、その後、このポリエステルの回収する。

【0043】誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）、インドールアクリル酸（IAA）等を培地に添加することができる。

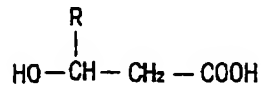
【0044】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えばRPMI-1640、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、30～37℃で14～28日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0045】本発明において、ポリエステルの精製は例えば以下のように行うことができる。培養液から遠心分離によって形質転換体を集め、蒸留水で洗浄した後、乾燥させる。その後、クロロホルムに乾燥形質転換体を懸

濁し、加熱することによってポリエステルを抽出する。なお、濾過によって残渣を取り除く。このクロロホルム溶液にメタノールを加えてポリエステルの沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去した後、乾燥して精製ポリエステルの得る。

〔0046〕得られたポリエステルが目的のものであることの確認は、通常の方法、例えばガスクロマトグラフ法、核磁気共鳴法等により行う。本発明の遺伝子はアエロモナス・キャビエから単離したポリエステル重合酵素をコードする遺伝子を含んでいる。この重合酵素は、次式I:

〔0047〕
〔化3〕



〔0048〕(Rは水素原子又は炭素数1~4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとした共重合体(ポリエステル)を合成することが可能である。上記共重合体としては、例えばポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HH))等が挙げられ、前記重合酵素遺伝子を導入した形質転換体はP(3HB-co-3HH)を極めて高効率で生産する能力を示す。

〔0049〕従来では、ポリ-3-ヒドロキシブチレート(P(3HB))あるいはポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリラート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HV))の製造法について研究、開発がなされたが、これらのポリエステルは高結晶性高分子のために耐衝撃性が劣るという物性上の問題がある。

〔0050〕炭素数6の3-ヒドロキシヘキサノエートをポリマー鎖に導入することによって結晶化度が低下するため、ポリエステルは柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れるが、アエロモナス・キャビエを用いた従来のP(3HB-co-3HH)製造法(特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報)では、ポリエステルの収率が低い。

〔0051〕これに対し、本発明ではP(3HB-co-3HH)共重合ポリエステルの高収率で生産することができる。上記手法により目的とするポリエステルの大量に得ることができるため、これを用いて生分解性の糸やフィルム、各種容器等の素材として利用することができる。また、本発明の遺伝子を用いてP(3HB-co-3HH)共重合ポリエステル高生産株を育種することもできる。

〔0052〕

〔実施例〕以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

〔実施例1〕アエロモナス・キャビエのポリエステル重

合酵素遺伝子のクローニング

最初に、アエロモナス・キャビエの染色体DNAライブラリーを作製した。

〔0053〕アエロモナス・キャビエFA440株を100mlのLB培地(1%イーストエキス、0.5%トリプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%グルコース、pH7.5)中、30°Cで終夜培養した後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム法(Currnt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 2.4.3.頁, 1994年; John Wiley & Sons 出版)により染色体DNAを得た。

〔0054〕得られた染色体DNAを制限酵素Sau3AIで部分分解した。またベクタープラスミドについては、コスミドベクターであるpLA2917(ATCC37355)を使用した。このプラスミドを制限酵素BglIIで切断し、脱リン酸化処理(Molecular Cloning, 1巻, 5.7.2 頁, 1989年; Cold Spring Harbor Laboratory 出版)を施した後、DNAリガーゼを用いて染色体DNA部分分解断片と連結させた。

〔0055〕この連結DNA断片を用いたインビトロ・パッケージング法(Currnt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 5.7.2 頁, 1994年)によって大腸菌S17-1株を形質転換し、アエロモナス・キャビエ染色体DNAライブラリーを得た。

〔0056〕次に、アエロモナス・キャビエのポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得るためのプローブを調製した。これまでに知られている数種のポリエステル重合酵素のアミノ酸配列でよく保存されている2つの領域を選択し、それをコードする核酸塩基配列を推定して5'-CC(C/G)CC(C/G)TCGATCAA(T/C)AAGT(T/A)(T/C)TA(T/C)ATC-3'(配列番号7)、及び5'-(C/C)AGCCA(G/C)GC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GCCACCA-3'(配列番号8)で表される2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

〔0057〕これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、アエロモナス・キャビエの染色体DNAを鋳型としたPCR法によってポリエステル重合酵素遺伝子を部分増幅した。PCRは、94°Cで30秒、50°Cで30秒及び72°Cで60秒の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行なった。この部分増幅断片をDIG DNA 標識キット(ベリンガーマンハイム社製)によってジゴキシゲニン標識し、プローブとした。

〔0058〕得られたプローブを用いてアエロモナス・キャビエ染色体DNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法によってポリエステル重合酵素遺伝子を含むプラスミドを有する大腸菌を単離した。この大腸菌からアルカリ法によってプラスミドを回収することでポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得た。この断片のBglII-EcoRI断片についてサンガー法によって塩基配列を決定した。その結果、配列番号9又は10で表される3.2kbp断片の塩基配列が決定された。

【0059】さらに、この塩基配列について相同性検索を行った結果、この3.2kbpの塩基配列の中には、配列番号1で表される塩基配列(1785bp)を含むポリエステル重合酵素遺伝子を同定することができた。なお、本発明においては、本発明のポリエステル重合酵素遺伝子によりコードされるタンパク質が、ポリエステル重合の遺伝子発現機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。

【0060】また、配列番号9又は10で表される塩基配列を有する断片において、上記1785bpの塩基配列の下流に存在する405bpの遺伝子(ORF3)及び転写終結領域、並びに上流に存在する354bpの遺伝子(ORF1)及び発現調節領域を同定した。ORF1の塩基配列を配列番号3、ORF1によりコードされるアミノ酸配列を配列番号4に、ORF3の塩基配列を配列番号5、ORF3によりコードされるアミノ酸配列を配列番号6に示す。ここで、ORF3はポリエステル合成に関与するエノイル-CoAヒドラーゼをコードする遺伝子のものである。そして、ORF3によりコードされるアミノ酸を有するポリペプチドがエノイル-CoAヒドラーゼ活性、特に(R)-特異的エノイル-CoAヒドラーゼ活性をもたらし、当該アミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。また、配列番号9及び10で表される塩基配列において、発現調節領域は第1~383番目であり、転写終結領域は第3010~3187番目である。

【0061】〔実施例2〕アルカリゲネス・ユートロファス形質転換体の作製

実施例1で同定された発現調節領域、ORF1、ポリエステル重合酵素遺伝子、ORF3及び転写終結領域を含むBglII-EcoRI断片のBglII部位をEcoRIリンカーを用いてEcoRI部位とし、3.2kbpのEcoRI-EcoRI断片(EE32断片)を得た。これをアルカリゲネス属に属する微生物中で発現可能なプラスミドpJRD215(ATCC37533)に挿入し、得られた組換えプラスミドでアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株(DSM541)(ポリエステル合成能欠損株)を接合伝達法によって形質転換した。

【0062】すなわち、まず、この組換えプラスミドを用いて大腸菌S17-1株を塩化カルシウム法によって形質転換した。この組換え大腸菌とアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株をLB培地1.5ml中、30℃で終夜培養し、それぞれの培養液0.1mlを混合し、30℃で4時間培養した。この菌体混合液をMBF寒天培地(0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム、0.5%フルクトース、1.5%寒天、0.3mg/mlカナマイシン)に塗布し、30℃で5日間培養した。

【0063】組換え大腸菌中のプラスミドがアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株に伝達されるとカナマイシン耐性を示すことから、MBF寒天培地上で増殖したコロニーはアルカリゲネス・ユートロファス形質転換体

である。この中から1個のコロニーを単離し、アルカリゲネス・ユートロファスAC32株(以下、AC32株と呼ぶ)を得た。なお、AC32株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-15786として寄託されている。

【0064】さらに合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異法(Currnt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 8.1.1頁, 1994年)によってEE32断片中のORF1遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BglII部位を導入し、BglII-BglII断片を欠失させることによってORF1遺伝子が欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC321株と呼ぶ。

【0065】同様に、部位特異的変異法によってEE32断片中のORF3遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BamHI部位を導入し、BamHI-BamHI断片を欠失させることによってORF3遺伝子が欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC323株と呼ぶ。

【0066】同様に、EE32断片中のORF1遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BglII部位を、ORF3遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BamHI部位を導入し、BglII-BglII断片およびBamHI-BamHI断片を欠失させることによってORF1遺伝子およびORF3遺伝子が共に欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC3213株と呼ぶ。

【0067】さらに、EE32断片を鋳型とし、PCR法によってポリエステル重合酵素遺伝子を増幅し、得られた増幅断片を、公知であるアルカリゲネス・ユートロファス由来ポリエステル合成系遺伝子の発現調節領域と転写終結領域との間に挿入した。PCRは、5'-AGTTCGCCCTCCCGTGTCCGTGAA-3'(配列番号11)および5'-GCCATATCCGCTCATCCCGCTCCT-3'(配列番号12)をプライマーとして、94℃で30秒、55℃で30秒及び72℃で60秒の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。

【0068】このDNA断片をプラスミドpJRD215に挿入し、得られた組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC29株と呼ぶ。

【0069】〔実施例3〕アルカリゲネス・ユートロファス形質転換体によるポリエステル合成
アルカリゲネス・ユートロファスH16株、PHB-4

株、AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株、AC29株を、それぞれ、95mlのMB培地（0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム）に1mlの1%オクタン酸ナトリウムを加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で培養した。AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株及びAC29株についてはカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。12時間、24時間、36時間及び48時間経過後にそれぞれ1mlの1%オクタン酸ナトリウムを添加しつつ（オクタン酸ナトリウムの総添加量0.5g）、72時間培養した。

【0070】H16株、及びAC3213株については上述のMB培地に1%オリーブ油、パーム油、コーン油、あるいはオレイン酸を加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で72時間培養した。なお、AC3213株を培養する際には、培地にカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。

【0071】H16株、AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株については上述のMB培地に1mlの1%ヘプタン酸ナトリウムを加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で培養した。なお、AC32株、AC321株、AC323株、及びAC3213株*

*を培養する際には、培地にカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。12時間、24時間、36時間及び48時間経過後にそれぞれ1mlの1%ヘプタン酸ナトリウムを添加しつつ（ヘプタン酸ナトリウムの総添加量0.5g）、72時間培養した。

【0072】培養後、遠心分離によって菌体を回収し、蒸留水で洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。乾燥菌体10～30mgに2mlの硫酸-メタノール混液（15:85）と2mlのクロロホルムを添加して密栓し、100℃で140分間加熱することにより、菌体内ポリエステル分解物のメチルエステルを得た。これに1mlの蒸留水を添加して激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーによって分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所製GC-14A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1（カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4μm）を用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃/分の速度で昇温した。得られた結果を表1、表2、および表3に示す。

【0073】

【表1】

表1 オクタン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成 3HB (モル%)	3HH
H16	3.00	86	100	0
PHB-4	0.80	0	-	-
AC32	0.99	33	78	23
AC321	2.85	92	87	13
AC323	2.85	92	88	12
AC3213	3.64	96	85	15
AC29	3.20	94	92	8

3HB: 3-ヒドロキシブチレート、3HH: 3-ヒドロキシヘキサノエート

【0074】

※ ※【表2】

表2 植物油またはオレイン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	炭素源	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成 3HB (モル%)	3HH
H16	オリーブ油	4.27	79	100	0
	コーン油	3.57	81	100	0
	パーム油	4.13	79	100	0
	オレイン酸	4.06	82	100	0
AC3213	オリーブ油	3.54	76	96	4
	コーン油	3.60	77	95	5
	パーム油	3.58	81	96	4
	オレイン酸	2.22	70	96	4

3HB: 3-ヒドロキシブチレート、3HH: 3-ヒドロキシヘキサノエート

【0075】

【表3】

表3 ヘプタン酸を炭素源としたポリエステル合成

使用菌株	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル含量 (重量%)	ポリエステル組成		
			3HB	3HV	3HHp
			(モル%)		
H16	2.50	60	50	50	0
AC32	0.77	7	30	67	5
AC321	1.67	55	46	52	2
AC323	1.27	40	48	45	7
AC3213	2.76	57	44	48	8

3HB : 3-ヒドロキシブチレート、3HV : 3-ヒドロキシバリレート
3HHp : 3-ヒドロキシヘプタノエート

【0076】オクタン酸を炭素源とした場合、表1に示すようにアルカリゲネス・ユートロファス野生株であるH16株ではポリ(3-ヒドロキシブチレート)ホモポリマーを合成する。これはH16株の有するポリエステル重合酵素は炭素数6の3HH(3-ヒドロキシヘキサノエート)を基質としないためである。そのポリエステル合成能欠損株であるPHB-4株では変異処理によってポリエステル重合酵素が欠損しているため、ポリエテルを蓄積しない。PHB-4株にアエロモナス・キャピエ由来のポリエステル重合酵素遺伝子を含むEE32断片を導入したAC32株では3HH(3-ヒドロキシヘキサノエート)分率22モル%のポリ(3-ヒドロキシブチレート-3ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HH))を乾燥菌体重量あたり33重量%蓄積した。

【0077】さらに、AC321株、AC323株、AC3213株では3HH分率12~15モル%のP(3HB-co-3HH)を92~96重量%蓄積し、ORF1遺伝子、ORF3遺伝子、あるいはその両方を欠失させることでポリエステル収率が著しく改善された。

【0078】また、導入したポリエステル重合酵素遺伝子の発現調節領域および転写終結領域をアルカリゲネス・ユートロファス由来のものに置換したAC29株でも、94重量%のP(3HB-co-3HH)を蓄積し、由来の異なる発現調節領域および転写終結領域を使用してもポリエステル収率が著しく改善された。

【0079】最もポリエステル収率の高いAC3213株をオリーブ油、コーン油、バーム油を炭素源として培養したところ、表2に示すように3HH分率4~5モル%のP(3HB-co-3HH)を76~81重量%蓄積した。植物油に最も多く含まれる脂肪酸成分であるオレイン酸を炭素源としても3HH分率4モル%のP(3HB-co-3HH)を70重量%で蓄積した。野生株であるH16株はこの条件下でポリ(3-ヒドロキシブチレート)ホモポリマーのみを合成した。

【0080】なお、アエロモナス・キャピエFA440株では、パルミチン酸を炭素源として8重量%のP(3HB-co-3HH)を蓄積することが報告されている(特開平7-265065号公報)。本発明においてはオクタン酸を炭素源として96重量%のP(3HB-co-3HH)が、また極めて安価である植物油を炭素源として76~81重量%のP(3HB-co-

3HH)が蓄積されることから、公報記載の方法と比較すると、本実施例で使用した形質転換体によるP(3HB-co-3HH)合成法は極めて優れた方法であると言える。

【0081】ヘプタン酸を炭素源とした場合、表2に示すようにアルカリゲネス・ユートロファス野生株であるH16株ではポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート)共重合体(P(3HB-co-3HV))を合成する。これはH16株の有するポリエステル重合酵素は炭素数7の3HHp(3-ヒドロキシヘプタノエート)を基質としないためである。PHB-4株にアエロモナス・キャピエ由来のポリエステル重合酵素遺伝子を含むEE32断片を導入したAC32株では3HHp分率5モル%のポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート-3-ヒドロキシヘプタノエート)三元共重合体(P(3HB-co-3HV-co-3HHp))を乾燥菌体重量あたり7重量%蓄積した。

【0082】さらに、AC321株、AC323株、AC3213株では3HHp分率2~8モル%のP(3HB-co-3HV-co-3HHp)を40~67重量%蓄積し、ORF1遺伝子、ORF3遺伝子、あるいはその両方を欠失させることでポリエステル収率が著しく改善された(表3)。

【0083】これらの結果から、アエロモナス・キャピエ由来のポリエステル重合酵素は炭素数4~7の3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする共重合ポリエステルを合成することができると言える。

【0084】〔実施例4〕ORF3の機能同定
EE32断片を鋳型として、PCR法によってORF3遺伝子を増幅し、発現プラスミドPET-3a(ノバジェン社製)のT7プロモーター下流に挿入した。PCRは5'-GCCATATGACCCGACAAATCCCTGCAAGTAG-3'(配列番号13)および5'-CTGGGATCCCCCGCTCTTAAGCCACCTTG-3'(配列番号14)をプライマーとして、95℃で60秒、68℃で30秒の反応を1サイクルとして25サイクル行った。得られたプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)株(ノバジェン社製)を形質転換した。得られた形質転換体を以下、NB3株とする。

【0085】NB3株を100mlのLB培地で30℃、4時間培養し、イソプロピルチオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度0.4mMとなるように添加して発現を誘導し、さらに30℃で2時間培養した。菌体を遠心分離によ

って回収した後、超音波破碎、遠心分離によって可溶性タンパク画分を得た。表4に示すように、発現プラスミドを導入した菌体の可溶性画分には高いエノイル-CoA

表4 可溶性タンパク画分のエノイル-CoAヒドラーゼ比活性
(ユニット/mgタンパク)

大腸菌BL21(DE3) 株/PET-3a	0
大腸菌NB3 株	1700

【0087】エノイル-CoAヒドラーゼ活性はクロトニル-CoA (シグマ社製) を基質とし (濃度0.25mM)、2重結合の水和に伴う吸光度変化 (263nm) を測定することにより求めた。一方、ORF3遺伝子を挿入していないコントロールプラスミドPET-3aを導入した大腸菌株では活性はまったく検出されなかった。

【0088】そこで、エノイル-CoAヒドラーゼタンパクの精製を行った。NB3株の可溶性タンパク画分をQ-セファロース陰イオン交換カラム (ファルマシア※

表5 エノイル-CoAヒドラーゼ比活性
(ユニット/mgタンパク)

大腸菌NB3株可溶性タンパク画分	1700
陰イオン交換カラム溶出画分	5100

【0090】得られた精製エノイル-CoAヒドラーゼタンパクのN末端アミノ酸配列を決定したところ、表6に示すように開始コドンであるMet 以外のアミノ酸配列は、ORF3遺伝子の塩基配列から推定したアミノ酸★

表6 アミノ酸配列の比較

精製エノイル-CoAヒドラーゼ N-末端アミノ酸配列:	SAQSLEVGQKARLSKRFGAA (配列番号15)
ORF3塩基配列から の推定アミノ酸配列:	MSAQSLEVGQKARLSKRFGAA (配列番号16)

【0092】このことから、ORF3がエノイル-CoAヒドラーゼをコードしていることが確認できた。Metは翻訳後修飾によって脱離したものと考えられる。また、ORF3にコードされるエノイル-CoAヒドラーゼの立体特異性について以下のように検討した。

【0093】活性測定の反応溶液に (S)-3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ (シグマ社製) (最終濃度0.2 ユニット/ml) と酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD+) (最終濃度0.5mM) を添加すると、エノイル-CoAヒドラーゼの特異性が (S)-体特異的であれば、生成した (S)-3-ヒドロキシブチリル-CoAはデヒドロゲナーゼの作用によってアセトアセチル-CoAに酸化される。それ☆

表7 1分後の340nmにおける吸光度変化

エノイル-CoAヒドラーゼ無添加	0.045
ORF3由来エノイル-CoAヒドラーゼ	0.047
(S)-体特異的エノイル-CoAヒドラーゼ (シグマ社製)	0.146

【0096】この結果から、精製エノイル-CoAヒドラーゼは (R)-体特異的であることが明らかとなった。従って、ORF3は (R)-体特異的エノイル-Co

* Aヒドラーゼ活性が検出された。

【0086】

【表4】

※社製) に負荷し、塩化ナトリウム濃度勾配 (0Mから1M) によってタンパクを溶出させ、エノイル-CoAヒドラーゼ活性画分を回収した。活性画分のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析から、図2に示すように電気泳動的に均一であることがわかった。また表5に示すように比活性を約3倍に向上させることができた。

【0089】

【表5】

★配列と一致した。

【0091】

【表6】

30☆に伴ってNAD+は還元されてNADHが生成し、340nmに特異的な吸収を生じる。逆にエノイル-CoAヒドラーゼが (R)-体特異的であれば、NADHは生成しない。

【0094】表7に示すように、ORF3にコードされるエノイル-CoAヒドラーゼを用いた場合では、340nmの吸光度変化はエノイル-CoAヒドラーゼ無添加の場合とほとんど同じであったが、市販の (S)-特異的エノイル-CoAヒドラーゼ (シグマ社製) を用いた場合では、NADHの生成に伴う吸光度変化が見ら

れた。

【0095】

【表7】

oAヒドラーゼをコードしていることが分かった。

【0097】

【発明の効果】本発明により、ポリエステル重合酵素遺

伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びポリエステルの製造方法が提供される。本発明の遺伝子は、炭素数4～7の3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする共重合ポリエステルを合成することが可能なポリエステル重合酵素をコードしている点で、また、本発明の製造方法は、熱安定性や成形性に優れた生分解性プラスチックであるP(3HB-co-3HH)を効率よく合成可能である点で有用である。 *

* {0098}

〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：1785

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列：

ATG ACC CAA CCA TCT TAT GCC CCG CTG TTC CAG CCC CTG GCC CAC TAC	48
Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr	
1 5 10 15	
AAT GAC AAG CTG CTG CCC ATG GCC AAG GCC CAG ACA GAG CCC ACC CCC	96
Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala	
20 25 30	
CAG CCG CTG CTG CAG ACC AAT CTG GAC GAT CTG CCC CAG GTG CTG CAG	144
Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu	
35 40 45	
CAG GCC AGC CAG CAA CCC TGG CAG CTG ATC CAG CCC CAG ATG AAC TGG	192
Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp	
50 55 60	
TGG CAG GAT CAG CTC AAG CTG ATG CAG CAC ACC CTG CTC AAA AGC GCA	240
Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala	
65 70 75 80	
GCC CAG CCG AGC GAG CCG CTG ATC ACC CCG CAG CCC AGC GAT CCC CCC	288
Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg	
85 90 95	
TTC AAG GCC GAG GCC TGG ACC GAA CAA CCC ATC TAT GAC TAC CTC AAG	336
Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys	
100 105 110	
CAG TCC TAC CTG CTC ACC GCC AGG CAC CTG CTG CCC TCG GTG GAT GCC	384
Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala	
115 120 125	
CTG GAG GGC GTC CCC CAG AAG ACC CCG GAG CCG CTG CGT TTC TTC ACC	432
Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr	
130 135 140	
CCC CAG TAC GTC AAC GCC ATG GCC CCC AGC AAC TTC CTG GCC ACC AAC	480
Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn	
145 150 155 160	
CCC GAG CTG CTC AAG CTG ACC CTG GAG TCC GAC CCC CAG AAC CTG GTG	528
Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val	
165 170 175	
CCC GGA CTG GCC CTC TTG GCC GAG GAT CTG CAG CCC AGC GCC GAT CAG	576
Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln	
180 185 190	
CTC AAC ATC CCG CTG ACC GAC GAA TCC GCC TTC GAG CTC CCG CCG GAT	624
Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp	
195 200 205	
CTG GCC CTG ACC CCG GCC CCG GTG GTG CAG CCC ACC CAG CTC TAT CAG	672
Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu	

21	22
210	215
CTC ATT CAG TAC AGC CCG ACT ACC GAG ACG GTG CCC AAG ACA CCT GTG	720
Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val	
225	230
CTG ATA GTG CCG CCC TTC ATC AAC AAG TAC TAC ATC ATG GAC ATG CCG	768
Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg	
245	250
CCC CAG AAC TCC CTG GTC GCC TGG CTG GTC CCC CAG GCC CAG ACG GTA	816
Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gly Gln Thr Val	
260	265
TTC ATG ATC TCC TGG CCG AAC CCG GCG GTG CCC CAG CCC CAA ATC GAT	864
Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp	
275	280
CTC GAC GAC TAC GTG GTG GAT GGC GTC ATC CCC GCC CTG GAC GCG GTG	912
Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val	
290	295
GAG GCG GCC ACC GCG GAG CCG GAG GTG CAC CCG ATC GCG TAC TCC ATC	960
Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile	
305	310
CGC GCG ACC GCG CTG TCG CTC GCC ATG GCG TGG CTG CCG CCG CCG CCC	1008
Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg	
325	330
CAG AAG CAG CCG GTG CCG ACC GCC ACC CTG TTC ACT ACC CTG CTG GAC	1056
Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp	
340	345
TTC TCC CAG CCC GCG GAG CTT GCG ATC TTC ATC CAC GAG CCC ATC ATA	1104
Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile	
355	360
CGC GCG CTC GAG CCG CAA AAT GAG GCC AAG CCG ATC ATG GAC CCG CCG	1152
Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg	
370	375
CAG CTG CCG GTC TCC TTC ACC CTG CTG CCG GAG AAC ACC CTC TAC TCG	1200
Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp	
385	390
AAC TAC TAC ATC GAC ACC TAC CTC AAG GGT CAG ACC CCG GTG CCG TTC	1248
Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe	
405	410
GAT CTG CTG CAC TGG AAC ACC GAC ACC ACC AAT GTG CCG CCG AAG ACC	1296
Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr	
420	425
CAC AAC ACC CTG CTG CCG CGT CTC TAC CTG GAG AAC CAG CTG GTG AAG	1344
His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys	
435	440
CGC GAG CTC AAG ATC CCG AAC ACC CCG ATC GAT CTC CCG AAG GTG AAG	1392
Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys	
450	455
ACC CCT GTG CTG CTG GTG TCG CCG GTG GAC GAT CAC ATC CCC CTC TCG	1440
Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp	
465	470
CAG CCC ACC TGG CAG CCG ATG AAG CTG TTT CCG CCG GAG CAG CCC TTC	1488

(13)

特開平10-108682

23

24

Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe
 485 490 495
 CTC CTG GCG GAG TCC CGC CAC ATC GCC GCG ATC ATC AAC CCG CCG GCC 1536
 Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala
 500 505 510
 CCC AAC AAG TAC GGC TTC TCG CAC AAC GCG CCC GAG CCC GAG AGC CCG 1584
 Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro
 515 520 525
 GAG AGC TGG CTG CCA GCG GCG ACG CAC CAG GCG GCG TCC TCG TCG CCC 1632
 Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro
 530 535 540
 GAG ATG ATG GCG TTT ATC CAG AAC CGT GAC GAA GCG TCA GAG CCC GTC 1680
 Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val
 545 550 555 560
 CCC GCG GCG GTC CCG GAG GAA GCG CTG GCC CCC GCG CCC GCG CAC TAT 1728
 Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr
 565 570 575
 GTC AAG GTG CCG CTC AAC CCC GTG TTT CCC TGC CCA ACA GAG GAG GAC 1776
 Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp
 580 585 590
 CCC GCA TGA 1785
 Ala Ala

【0099】配列番号: 2

*トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 594

配列の種類: タンパク質

配列の型: アミノ酸

*

配列:

Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr
 1 5 10 15
 Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala
 20 25 30
 Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu
 35 40 45
 Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp
 50 55 60
 Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala
 65 70 75 80
 Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg
 85 90 95
 Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys
 100 105 110
 Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala
 115 120 125
 Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr
 130 135 140
 Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn
 145 150 155 160
 Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val
 165 170 175
 Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln
 180 185 190

25

26

Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp

195

200

205

Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu

210

215

220

Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val

225

230

235

240

Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg

245

250

255

Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gly Gln Thr Val

260

265

270

Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp

275

280

285

Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val

290

295

300

Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile

305

310

315

320

Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg

325

330

335

Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp

340

345

350

Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile

355

360

365

Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg

370

375

380

Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp

385

390

395

400

Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe

405

410

415

Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr

420

425

430

His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys

435

440

445

Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys

450

455

460

Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp

465

470

475

480

Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe

485

490

495

Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala

500

505

510

Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro

515

520

525

Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro

530

535

540

Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val

545

550

555

560

Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr

565

570

575

Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp

580

585

590

(15)

特開平10-108682

27

28

Ala Ala

【0100】配列番号: 3

配列の長さ: 354

配列の型: 核酸

* 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: genomic DNA

配列:

```

ATG ATG AAT ATG GAC GTG ATC AAG AGC TTT ACC GAG CAG ATG CAA GCC   48
Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly
   1           5           10           15
TTC GCC GCC CCC CTC ACC CCC TAC AAC CAG CTG CTG CCC AGC AAC ATC   96
Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile
           20           25
           30
GAA CAG CTG ACC CGG TTG CAG CTG GCC
TCC GCC AAC GCC TAC GCC GAA   144
Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu
           35           40
           45
CTG GGC CTC AAC CAG TTG CAG GCC GTG
AGC AAG GTG CAG GAC ACC CAG   192
Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln
           50           55
           60
AGC CTG GCG GCC CTG GGC ACA GTG CAA
CTG GAG ACC GCC AGC CAG CTC   240
Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu
           65           70
           75           80
TCC CGC CAG ATG CTG GAT GAC ATC CAG
AAG CTG AGC GCC CTC GGC CAG   288
Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln
           85
           90           95
CAG TTC AAG GAA GAG CTG GAT GTC CTG
ACC GCA GAC GGC ATC AAG AAA   336
Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys
           100           105
           110
AGC ACG GGC AAG GCC TGA
           354
Ser Thr Gly Lys Ala
           115

```

【0101】配列番号: 4

配列の長さ: 117

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

(16)

特開平10-108682

29

30

配列:

Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser
Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly

1

5

10

15

Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile

20

25

30

Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu

35

40

45

Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln

50

55

60

Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu

65

70

75

80

Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln

85

90

95

Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys

100

105

110

Ser Thr Gly Lys Ala

115

【0102】配列番号: 5

配列の長さ: 405

配列の型: 核酸

*鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: genomic DNA

配列:

ATG AGC GCA CAA TCC CTG GAA GTA GGC
CAG AAG GCC CGT CTC AGC AAG 48
Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly
Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys

1

5

10

15

CGG TTC GGG GCG GCG GAG GTA GCC GCC
TTC GCC GCG CTC TCG GAG GAC 96

Arg Phe Gly Ala Ala Glu Val Ala Ala
Phe Ala Ala Leu Ser Glu Asp

20

25

30

TTC AAC CCC CTG CAC CTG GAC CCG GCC
TTC GCC GCC ACC ACG GCG TTC 144

Phe Asn Pro Leu His Leu Asp Pro Ala

(17)

特開平10-108682

31	Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Phe	
			35					40
			45					
	GAG	CGG	CCC	ATA	GTC	CAC	GGC	ATG CTG
	CTC	GCC	AGC	CTC	TTC	TCC	GGG	192
	Glu	Arg	Pro	Ile	Val	His	Gly	Met Leu
	Leu	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	Gly	
		50					55	
			60					
	CTG	CTG	GGC	CAG	CAG	TTG	CCG	GGC AAG
	GGG	AGC	ATC	TAT	CTG	GGT	CAA	240
	Leu	Leu	Gly	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly Lys
	Gly	Ser	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gln	
	65					70		
		75					80	
	AGC	CTC	AGC	TTC	AAG	CTG	CCG	GTC TTT
	GTC	GGG	GAC	GAG	GTG	ACG	GCC	288
	Ser	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Pro	Val Phe
	Val	Gly	Asp	Glu	Val	Thr	Ala	
					85			
	90				95			
	GAG	GTG	GAG	GTG	ACC	GCC	CTT	CGC GAG
	GAC	AAG	CCC	ATC	GCC	ACC	CTG	336
	Glu	Val	Glu	Val	Thr	Ala	Leu	Arg Glu
	Asp	Lys	Pro	Ile	Ala	Thr	Leu	
				100				105
				110				
	ACC	ACC	CGC	ATC	TTC	ACC	CAA	GGC GGC
	GCC	CTC	GCC	GTG	ACG	GGG	GAA	384
	Thr	Thr	Arg	Ile	Phe	Thr	Gln	Gly Gly
	Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Gly	Glu	
			115					120
			125					
	GCC	GTG	GTC	AAG	CTG	CCT	TAA	
								405
	Ala	Val	Val	Lys	Leu	Pro		
		130						

【0103】配列番号:6

配列の長さ:134

配列の型:アミノ酸

*トポロジー:直鎖状

配列の種類:タンパク質

*40

配列:

Met	Ser	Ala	Gln	Ser	Leu	Glu	Val	Gly
Gln	Lys	Ala	Arg	Leu	Ser	Lys		
1				5				
10				15				
Arg	Phe	Gly	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Ala
Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Asp		
			20					25
			30					
Phe	Asn	Pro	Leu	His	Leu	Asp	Pro	Ala

33

34

Phe Ala Ala Thr Thr Ala Phe

35

40

45

Glu Arg Pro Ile Val His Gly Met Leu

Leu Ala Ser Leu Phe Ser Gly

50

55

60

Leu Leu Gly Gln Gln Leu Pro Gly Lys

Gly Ser Ile Tyr Leu Gly Gln

65

70

75

80

Ser Leu Ser Phe Lys Leu Pro Val Phe

Val Gly Asp Glu Val Thr Ala

85

90

95

Glu Val Glu Val Thr Ala Leu Arg Glu

Asp Lys Pro Ile Ala Thr Leu

100

105

110

Thr Thr Arg Ile Phe Thr Gln Gly Gly

Ala Leu Ala Val Thr Gly Glu

115

120

125

Ala Val Val Lys Leu Pro

130

【0104】配列番号: 7

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

配列:

CCSCCSTGGA TCAAYAAGTW YTAYATC

27

【0105】配列番号: 8

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

配列:

SACCCASGCS GTCCARTCSG GCCACCA

27

【0106】配列番号: 9

配列の長さ: 3187

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

配列:

ACATCTGGAC CCGGGTGCTG CCCTGGGCCA CCCCAGGCGAG CCCACGCGG GAGCAACCGA 60
 CCACGACGGC GAGACGTTTC ATCGGATTC CTTGCCAGTC TGAATGACGT CCACGCTAT 120
 CAGCGCGCGG CCGGTGCGGC GAGGCGCGCC CGACCCAGT CCGTCACCTC TCGTCTGATC 180
 CCCCTCCCTC GACGCGCGTC GCTCACA AAAA AAATTC AAAC AGAAATTAAC ATTTATGTCA 240
 TTTACACCAA ACCGCATTG GTTCAGAAT GCTCAAACGT GTGTTTGAAC AGACCAAGCA 300
 ACACGTA AAC ACGGATGACA TCCAGTACCC GTAAGAAGG CCGATTGCCC CACAACAACA 360
 CTGTTCTGCC GAAC TGAGA CCG ATG ATG AAT ATG GAC GTG ATC AAG AGC 410

Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser

* 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

* 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

★ 配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 384..734

特徴を表す記号: CDS

40 存在位置: 830..2611

★

35

36

	1	5	
TTT ACC GAG CAG ATG CAA GGC TTC GCC GCC CCC CTC ACC CGC TAC AAC	458		
Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn			
10 15 20 25			
CAG CTG CTG CCC AGC AAC ATC GAA CAG CTG ACC CGG TTG CAG CTG CCC	506		
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala			
30 35 40			
TCC GCC AAC CCC TAC CCC GAA CTG GGC CTC AAC CAG TTG CAG CCC GTG	554		
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val			
45 50 55			
AGC AAG GTG CAG GAC ACC CAG AGC CTG GCG CCC CTG GCG ACA GTG CAA	602		
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln			
60 65 70			
CTG GAG ACC CCC AGC CAG CTC TCC CGC CAG ATG CTG GAT GAC ATC CAG	650		
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln			
75 80 85			
AAG CTG AGC CCC CTC GGC CAG CAG TTC AAG GAA GAG CTG GAT GTC CTG	698		
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu			
90 95 100 105			
ACC GCA GAC GGC ATC AAG AAA AGC ACG GCG AAG GCG TGATAACCCC	744		
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys Ser Thr Gly Lys Ala			
110 115			
TGGCTGCCCG TTCGGCCAGC CACATCTCCC CATGACTCGA CCTACCGGC TAGTTCCCCC	804		
CTCGGGTGTG GGTGAAGGAG AGCAC ATG AGC CAA CCA TCT TAT GCG CCG CTG	856		
Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu			
1 5			
TTC GAG GCC CTG GCC CAC TAC AAT GAC AAG CTG CTG GCC ATG GCC AAG	904		
Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys			
10 15 20 25			
GCC CAG ACA GAG CGC ACC GCC CAG GCG CTG CTG CAG ACC AAT CTG GAC	952		
Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp			
30 35 40			
GAT CTG GGC CAG GTG CTG GAG CAG GGC AGC CAG CAA CCC TGG CAG CTG	1000		
Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu			
45 50 55			
ATC CAG GCC CAG ATG AAC TCG TGG CAG GAT CAG CTC AAG CTG ATG CAG	1048		
Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln			
60 65 70			
CAC ACC CTG CTC AAA AGC CCA GGC CAG CCG AGC GAG CCG GTG ATC ACC	1096		
His Thr Leu Leu Lys Ser Ala Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr			
75 80 85			
CCG GAG CGC AGC GAT CGC CCC TTC AAG GCC CAG GCC TCG AGC GAA CAA	1144		
Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln			
90 95 100 105			
CCC ATC TAT GAC TAC CTC AAG CAG TCC TAC CTG CTC ACC CCC AGC CAC	1192		
Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His			
110 115 120			
CTG CTG GCC TCG GTG GAT GCC CTG GAG GCC GTC CCC CAG AAG AGC CCG	1240		
Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg			
125 130 135			

37

38

GAG CGG CTG CGT TTC TTC ACC CGC CAG TAC GTC AAC GCC ATG CCC CCC 1288
 Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro

140

145

150

ACC AAC TTC CTG GCC ACC AAC CCC GAG CTG CTC AAG CTG ACC CTG GAG 1336

Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu

155

160

165

TCC GAC GGC CAG AAC CTG GTG CGC GGA CTG CCC CTC TTG GCC GAG GAT 1384

Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp

170

175

180

185

CTG GAG CGC AGC GCC GAT CAG CTC AAC ATC CCC CTG ACC GAC GAA TCC 1432

Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser

190

195

200

CCC TTC GAG CTC GCG CGG GAT CTG GCC CTG ACC CCC GCG CGG GTG GTG 1480

Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val

205

210

215

CAG CCC ACC GAG CTC TAT GAG CTC ATT CAG TAC ACC CCG ACT ACC CAG 1528

Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu

220

225

230

ACG GTG GCG AAG ACA CCT GTG CTG ATA GTG CCG CCC TTC ATC AAC AAG 1576

Thr Val Gly Lys Thr Pro Val Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys

235

240

245

TAC TAC ATC ATG GAC ATG CCG CCC CAG AAC TCC CTG GTC CCC TGG CTG 1624

Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu

250

255

260

265

GTC GCC CAG GGC CAG ACG GTA TTC ATG ATC TCC TCG CCG AAC CCG GCG 1672

Val Ala Gln Gly Gln Thr Val Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly

270

275

280

GTG GCC CAG GCC CAA ATC GAT CTC GAC GAC TAC GTG GTG GAT GCG GTC 1720

Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val

285

290

295

ATC GCC GCC CTG GAC GCG GTG GAG GCG GCC ACC GCG GAG CCG GAG GTG 1768

Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val

300

305

310

CAC GCC ATC GCG TAC TGC ATC GCG GCG ACC GCG CTG TCG CTC GCG ATG 1816

His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met

315

320

325

GCG TCG CTG GCG GCG GCG CCG CAG AAG CAG CCG GTG CCG ACC GCG ACC 1864

Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr

330

335

340

345

CTG TTC ACT ACC CTG CTG GAC TTC TCC CAG CCC GCG GAG CTT GCG ATC 1912

Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile

350

355

360

TTC ATC CAC GAG CCC ATC ATA CCG GCG CTC GAG CCG CAA AAT GAG CCC 1960

Phe Ile His Glu Pro Ile Ile Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala

365

370

375

AAG GCC ATC ATG GAC CCG CCG CAG CTG CCG GTC TCC TTC ACC CTG CTG 2008

Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu

380

385

390

CGG GAG AAC AGC CTC TAC TCG AAC TAC TAC ATC GAC AGC TAC CTC AAG 2056

Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys

39	40
395	400
CGT CAG AGC CCG GTG GCC TTC GAT CTG CTG CAC TGG AAC AGC GAC ACC	2104
Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser	
410	415
ACC AAT GTG CCG GCG AAG ACC CAC AAC ACC CTG CTG CCG CGT CTC TAC	2152
Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr	
430	435
CTG GAG AAC CAG CTG GTG AAG GGG GAG CTC AAG ATC CCG AAC ACC CCG	2200
Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg	
445	450
ATC GAT CTC GCG AAG GTG AAG ACC CCT GTG CTG CTG GTG TCG CCG GTG	2248
Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val	
460	465
GAC GAT CAC ATC CCC CTC TCG CAG GCG ACC TGG CAG GCG ATG AAG CTG	2296
Asp Asp His Ile Ala Leu Trp Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu	
475	480
TTT GCG GGG GAG CAG CCG TTC CTC CTG GCG GAG TCC GCG CAC ATC CCC	2344
Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala	
490	495
GCG ATC ATC AAC CCG CCG GCG ACC AAC AAG TAC GCG TTC TGG CAC AAC	2392
Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn	
510	515
GCG GCG GAG CCG GAG AGC CCG GAG AGC TGG CTG CCA GCG GCG ACC CAC	2440
Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His	
525	530
CAG GCG GCG TCC TGG TGG CCC GAG ATG ATG CCG TTT ATC CAG AAC CGT	2488
Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg	
540	545
CAC GAA GCG TCA GAG CCC GTC CCC CCG CCG GTC CCG GAG GAA CCG CTG	2536
Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu	
555	560
GCC CCC GCG CCC GCG CAC TAT GTC AAG GTG CCG CTC AAC CCC GTG TTT	2584
Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe	
570	575
GCC TCC CCA ACA GAG GAG GAC GCC GCA TGACCGCACA ATCCCTCGAA	2631
Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp Ala Ala	
590	
GTAGCCGAGA AGGCCCGTCT CAGCAAGCCG TTCGGGGCCG CCGAGGTAGC CCGCTTCGCC	2691
CGGCTCTCGG AGGACTTCAA CCCCCTGCAC CTGGACCCCG CCTTCGCGGC CACCAAGCCG	2751
TTCGACCGGC CCATAGTCCA CCGCATGCTG CTCGCCACCC TCTTCTCCCG CCGCTCGGC	2811
CACGAGTTGC CCGCAAGGG GAGCATCTAT CTGGTCAAA CCCTCAGCTT CAAGCTCCCG	2871
GTCTTTGTGC CCGACGAGGT GACGGCCGAG GTGGAGGTGA CCGCCCTTCG CCGAGACAAG	2931
CCCATCGCCA CCTGACCCAC CCGCATCTTC ACCCAAGCCG GCGCCCTCCG CGTGACGGCG	2991
CAAGCCGTGG TCAAGCTGCC TTAAGCACCG GCGGCACCCA CCGACAATCA CCGCGCCCC	3051
TGCGCGGCTG ATTGTTCTCC CCGCTCCCC TTGCCCCCTT TTTGCGGCA ATTTGCCCA	3111
GGCCCTTCC CTGCCCCGC TAAGTGCTA AAATGCGCGC CCGCGCGTGT AGGCATTAT	3171
CCAGCTAGAG GAATTC	3187

(0107) 配列番号: 10

配列の長さ: 3187

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

50. 配列の種類: genomic DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

* 存在位置：2611...3012

*

配列：

AGATCTGGAC CGGGTGCTG GCCTGGGCCA CCCCCGCCAG CCCCAGCCCG GACCAACCGA 60
 CCAGCAGGGC GAGAGTTTC ATCGGATTC CTGGCAGTC TGAATGACGT CCCAGCCTAT 120
 CAGCGCCGGC CCGGTCCGC GAGGGCCGC CGACCCAGT CCGTCACTC TCGTCTGATC 180
 CCGCTCCCTC GACGGCGTC GCTGACAAA AAATTCAAAC AGAAATTAAC ATTTATGTCA 240
 TTTACACCAA ACCGCATTG GTTCAGAAT GCTCAAACGT GTGTTTGAAC AGAGCAAGCA 300
 ACACGTAAAC AGGGATGACA TCCAGTACCC GTAAGAACGG CCGATTGCC CACAACAACA 360
 CTGTTCTGCC GAACTGGAGA CCGATGATCA ATATGGACGT GATCAAGACC TTTACCGACC 420
 AGATGCAAG CTTCGCCCC CCCCTACCC GCTACAACCA CTTGCTGCC AGCAACATCG 480
 AACAGCTGAC CCGGTTGCAG CTGCCCTCCG CCAACGCCA CCCCGAACGT CCGCTCAACC 540
 AGTTGCAGGC CGTGAGCAAG GTCAGGACA CCCAGAGCT CCGGCCCTG CCGACAGTGC 600
 AACTGGAGAC CCCCAGCCAG CTCTCCCGC AGATGCTGA TCACATCCAG AAGCTGACCG 660
 CCTCGCCA GCAGTTCAAG GAAGAGCTG ATGTCTGAC CCGAGACGC ATCAAGAAAA 720
 GCACGGCAA GCGCTGATA CCCCTGGCT CCGTTCCGG CAGCCACATC TCCCATGAC 780
 TCGAGCTAC GGGTAGTTC CCGCTCCGG TGTGGGTGA CGAGAGACA TGAGCCAACC 840
 ATCTTATGC CCGTGTTCG AGGCCCTGC CCACTACAAT GACAAGCTC TGGCCATGC 900
 CAAGCCCGC ACAGAGCCA CCGCCAGCC CTTGCTGAG ACCAATCTG ACGATCTCG 960
 CCAGTGCTG GAGCAGGCA GCCAGCAACC CTGCGAGCT ATCCAGGCC AGATGAACGT 1020
 GTGGCAGAT CAGCTCAAGC TGATGAGCA CACCCTGTC AAAAGCCAG CCCAGCCGAG 1080
 CGAGCCGTG ATACCCCGG AGCCGAGCA TCCCGCTTC AAGGCCGAG CCGGAGCGA 1140
 ACAACCATC TATGACTACC TCAAGCAGT CTACCTGTC ACCGCCAGC ACCTGCTGC 1200
 CTCGTCGAT CCGCTGAGG CCGTCCCCA GAAGAGCCG CAGCCGCTC GTTCTTCAC 1260
 CCGCCAGTAC GTCAACCCA TGGCCCCAG CAACCTCTG GCCACCAACC CCGAGTCTC 1320
 CAAGCTGACC CTGGAGTCG AGGCCAGAA CCTGTGCGC GACTGCCC TCTTGCCGA 1380
 CGATCTGAG CCGAGCCCG ATCAGCTCA CATCCGCTG ACCGACGAAT CCGCCTTCA 1440
 CTTCCGCCG GATCTGCCC TGACCCCGG CCGGTGGT GAGCCACCG AGCTTATGA 1500
 GCTCATTAG TACAGCCGA CTACCGAGC GGTGGGAAG ACACCTGTC TGATAGTCC 1560
 CCGCTTATC AACAGTACT ACATCATGA CATCCGCC CAGAACTCC TGTCCCTG 1620
 CCGTCTGCC CAGGCCAGA CGGTATCAT GATCTCTG CCAACCCCG CCGTCCCA 1680
 CCCCCAATC GATCTGAGC ACTACGTGT GGATGCGTC ATCGCCGCC TCGACCCGT 1740
 CGAGCCGCC ACCGCCAGC GGGAGTGCA CCGATCCG TACTGCATC CCGCCACCG 1800
 CCTGTGCTC GGCATGGCT GGTGGGCC GCGCGCCAG AAGCAGCGG TCGCACCCG 1860
 CACCTGTTT ACTACCTGC TGGACTTCT CCAGCCCGG GAGCTTGCA TCTTCATCA 1920
 CGAGCCATC ATAGCCGCC TCGAGGCCA AATGAGGCC AAGGCCATCA TCGACCCCG 1980
 CCAGTGGG GTCTCCTCA CCGTGTGCG GGAGAACAG CTCTACTGA ACTACTACAT 2040
 CGACAGTAC CTCAGGGTC AGAGCCCGT GCGCTTCAT CTGCTCACT CGAACAGCA 2100
 CAGCACCAAT GTGGCGGCA AGACCCCAA CAGCTGCT CCGCTCTCT ACCTGAGAA 2160
 CCAGCTGTG AAGGGGAGC TCAAGATCC CAACACCCG ATCGATCTG CCAAGGTGA 2220
 GACCCCTGT CTGCTGTGT CCGCGTGCA CGATCACAT CCGCTCTGC AGGCCACCTG 2280
 CGAGGCATG AAGCTGTTT GCGGGAGCA GCGCTTCTC CTGGCGAGT CCGCCACAT 2340
 CCGCGCATC ATCAACCCG CCGCGCCA CAAGTACGC TTCTGGACA ACGGGCGCA 2400
 CCGCGAGC CCGAGAGCT GGTGGCAG GCGACGCAC CAGGCGGCT CCGTGTGCC 2460
 CGAGATGAT GCGTTTATC AGAACCGTC CGAAGCGTC GAGCCGTC CCGCCCGGT 2520
 CCGGAGCAA CCGTCCGCC CCGCCCCG CCACTATGT AAGTGCGC TCAACCCGT 2580
 GTTTCCTGC CCAACAGAG AGGAGCCCG ATG AGC GCA CAA TCC CTG GAA GTA 2634

Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val

43 44
 Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys Arg Phe Gly Ala Ala Glu Val Ala
 10 15 20
 CCC TTC GCC CCG CTC TCG GAG GAC TTC AAC CCC CTG CAC CTG GAC CCG 2730
 Ala Phe Ala Ala Leu Ser Glu Asp Phe Asn Pro Leu His Leu Asp Pro
 25 30 35 40
 CCC TTC GCC CCG ACC ACG CCG TTC GAG CCG CCC ATA GTC CAC GCC ATG 2778
 Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Phe Glu Arg Pro Ile Val His Gly Met
 45 50 55
 CTG CTC GCC AGC CTC TTC TCC GCG CTG CTG CCG CAG CAG TTG CCG GCC 2826
 Leu Leu Ala Ser Leu Phe Ser Gly Leu Leu Gly Gln Gln Leu Pro Gly
 60 65 70
 AAG GCG ACC ATC TAT CTG GGT CAA ACC CTC ACC TTC AAG CTG CCG GTC 2874
 Lys Gly Ser Ile Tyr Leu Gly Gln Ser Leu Ser Phe Lys Leu Pro Val
 75 80 85
 TTT GTC GCG GAC GAG GTG ACG GCC GAG GTG GAG GTG ACC GCC CTT CCC 2922
 Phe Val Gly Asp Glu Val Thr Ala Glu Val Glu Val Thr Ala Leu Arg
 90 95 100
 GAG GAC AAG CCC ATC GCC ACC CTG ACC ACC CCG ATC TTC ACC CAA GCC 2970
 Glu Asp Lys Pro Ile Ala Thr Leu Thr Thr Arg Ile Phe Thr Gln Gly
 105 110 115 120
 GCC GCC CTC GCC GTG ACG CCG GAA GCC GTG GTC AAG CTG CCT 3012
 Gly Ala Leu Ala Val Thr Gly Glu Ala Val Val Lys Leu Pro
 125 130
 TAAGCACCG CCGCACCGAG GCACAATCAG CCGCGCCCT GCGCGCTGA TTGTTCTCCC 3072
 CCGCTCCGCT TCGCCCTTT TTCGGGCAA TTGCGCCAG GCCCTTCCC TCGCCCGCT 3132
 AACTGCTAA AATGCCGCC CTGCCGTGA GGCATTCATC CAGCTAGAG AATC 3187

【0108】配列番号：11

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列：

AGTTCCCCC TCGGTGTGG GTGAA

25

【0109】配列番号：12

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列：

GCCATATCG CTCATCGGC GTCTT

25

【0110】配列番号：13

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

GCCATATGAG CCGACAATCC CTGGAAGTAG

30

【0111】配列番号：14

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CTGGATCCG CCGTGCTTA AGCGAGCTTG

30

【0112】配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

配列：

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

◆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

45
Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys Arg
1 5 10 15
Phe Gly Ala Ala
20

【0113】配列番号：16

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列：

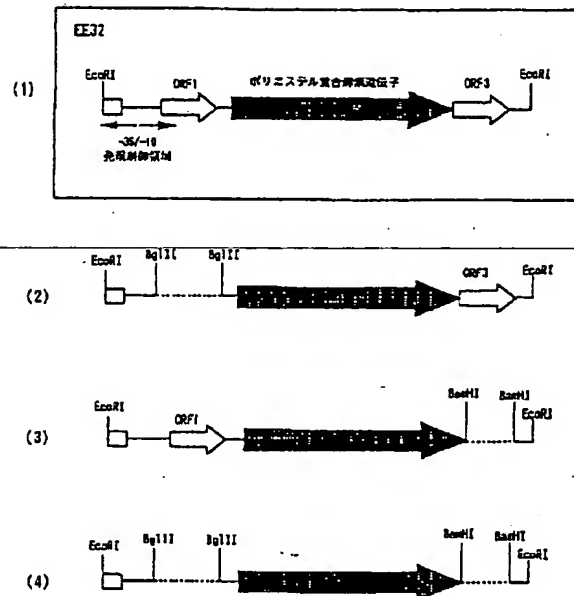
Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys
1 5 10 15
Arg Phe Gly Ala Ala
20

【図面の簡単な説明】

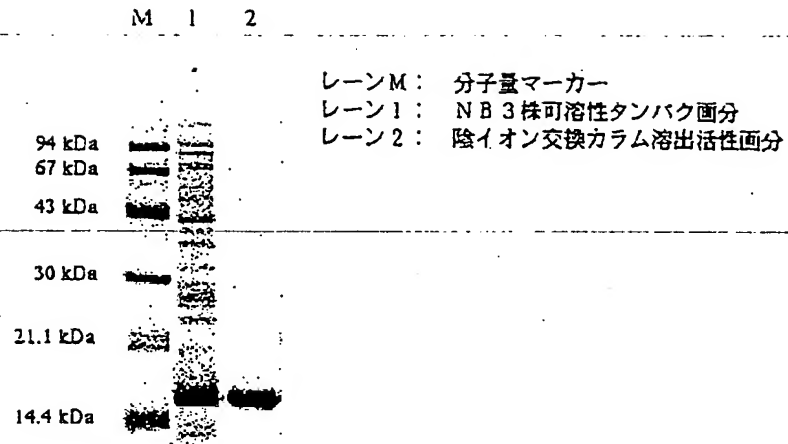
【図1】本発明の遺伝子の構築図である。

※【図2】SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真である。

【図1】



〔図2〕



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
/(C 1 2 N	1/21	
C 1 2 R	1:05)	
(C 1 2 N	9/88	
C 1 2 R	1:05)	
(C 1 2 P	7/62	
C 1 2 R	1:05)	